BD

BBL Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate

CE

L007501 • Rev. 07 • Octobre 2006

PROCEDURES DE CONTROLE DE QUALITE

I INTRODUCTION

La Seven H11 Agar est un milieu servant à l'isolement et à la culture des mycobactéries. L'acide aspartique et le pyruvate de sodium incorporés favorisent la croissance bactérienne et la production de niacine.

II MODE OPERATOIRE DU TEST

A. Préparation des inoculums

1. A l'aide d'écouvillons stériles, ensemencer des géloses inclinées Lowenstein-Jensen avec des cultures mères des souches de mycobactéries concernées.
2. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone, jusqu'à obtention d'une croissance bactérienne importante (habituellement en 2 à 3 semaines).
3. Récolter les colonies à l'aide d'un écouvillon à bout vif en veillant à ne pas emporter de milieu de culture avec les cellules.
   a. *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 25177 :
      (1) Transférer les colonies dans 5,0 mL de bouillon Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol dans un tube de verre à bouchon à vis stérile, contenant des billes de verre stériles.
      (2) Homogénéiser la suspension à l'agitateur à vortex (pendant plusieurs min) jusqu'à disparition des agrégats de grande taille.
      (3) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
      (4) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.
      (5) Transférer le surnageant dans un récipient stérile.
      (6) Ajouter lentement du Middlebrook 7H9 Broth with Glycerol stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1. Bien agiter.
      (7) Diluer à 10^5 UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemencer par striage le milieu de test à l'aide d'un ensemenceur à anse calibrée de 0,01 mL.
   b. Autres souches de mycobactéries :
      (1) Transférer les colonies prélevées dans un tube à centrifuger à bouchon à vis de 50 mL, contenant 8 à 12 billes de verre stériles (2 mm de diamètre) et 5 mL de diluant Mycobacterium Diluent préparé comme suit :
      - Mélanger les ingrédients suivants dans une fiole de 1 L et ajuster le pH à 6,7 à 7,0 avec de la soude 1 N

Albumine bovine sans acide gras	1,0 g
Polysorbate 80	0,1 mL
Eau purifiée	500 mL

      - Stériliser par filtration sur membrane (porosité de 0,2 micron)
      - Distribuer en conditions aseptiques 5,5 mL de solution dans des tubes à bouchon à vis stériles.

      (2) A l'aide d'un écouvillon, émulsifier les colonies de mycobactéries sur la paroi d'un tube à centrifuger à bouchon à vis. Mélanger les colonies avec le diluant.
      (3) Boucher le tube et mélanger à l'agitateur à vortex pendant environ 10 min jusqu'à disparition des agrégats de grande taille dans la suspension.
      (4) Ajouter 15 mL de Mycobacterium Diluent stérile et bien mélanger.
      (5) Comparer la turbidité de cette suspension à celle d'un standard de turbidité McFarland n° 1. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard.
      (6) Laisser reposer le tube dans un portoir pendant 2 à 3 h à température ambiante pour faire sédimenter les particules de grande taille.
      (7) Aspirer le surnageant et le transférer dans un récipient stérile. La suspension obtenue doit présenter une turbidité supérieure à celle du standard McFarland n° 1, sans

particules de grande taille. S'il reste de telles particules, mélanger et laisser reposer pendant encore 1 h. Transférer le surnageant dans un récipient stérile.

(8) Ajouter lentement du Mycobacterium Diluent stérile pour ajuster la turbidité de la suspension à celle du standard McFarland n° 1. Bien agiter.

(9) Aliquoter la suspension dans des flacons supportant la congélation. Reporter l'identité du microorganisme et la date de préparation sur l'étiquette.

(10) Congeler les flacons à -60 °C. Les suspensions se conservent jusqu'à 6 mois.

(11) Pour décongeler la suspension, placer le flacon congelé au bain-marie entre 30 et 35 °C. Diluer à 10^5 UFC/mL avant l'emploi. Bien mélanger et ensemencer par striage le milieu de test à l'aide d'un ensemenceur à anse calibrée de 0,01 mL.

B. Méthode de test du milieu

1. Ensemencer des échantillons représentatifs avec les cultures répertoriées ci-dessous.
   a. S'assurer que les surfaces de la gélose sont exemptes d'humidité avant de les ensemencer.
   b. A l'aide d'ensemenceurs à anse calibrée de 0,01 mL stériles jetables, ensemencer les tubes avec les cultures de mycobactéries préparées comme ci-dessus.
   c. Incuber les tubes, avec les bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère aérobie enrichie en dioxyde de carbone.
2. Examiner les tubes après 7, 14 et, le cas échéant, 21 jours pour évaluer la croissance bactérienne et évaluer les réactions. Une culture doit comporter au moins 50 à 100 colonies pour qu'un test de la niacine donne les résultats escomptés.
3. Test de la niacine :
   a. Ajouter 1,0 mL de bouillon Middlebrook 7H9 Broth avec polysorbate 80 à la gélose de culture inclinée.
   b. Perforer en plusieurs points la surface de la gélose inclinée afin de mettre le liquide au contact du milieu. La niacine éventuellement présente est extraite du milieu et non des colonies.
   c. Incliner les tubes de sorte que le bouillon couvre la gélose inclinée. Laisser l'extraction se poursuivre pendant 30 min.
   d. Prélever environ 0,6 mL d'extrait et le déposer dans un tube de 12 x 75 mm. Ajouter 0,6 mL de bouillon Middlebrook 7H9 avec polysorbate 80 à un autre tube de 12 x 75 mm comme contrôle négatif. Ajouter 0,6 mL de bouillon à un autre tube de 12 x 75 mm ainsi qu'un disque **Taxo** TB Niacin Test Control comme contrôle positif.
   e. A chacun des tubes ci-dessus, ajouter une bandelette réactive **Taxo** TB Niacin Test Strip. Boucher hermétiquement le tube immédiatement après avoir ajouté la bandelette car l'oxygène influe sur les résultats.
   f. Patienter 12 à 15 min (sans dépasser 30 min), puis examiner le bouillon dans chaque tube. L'apparition d'une coloration jaune indique un test de la niacine positif. L'absence de coloration indique un test négatif.
4. Résultats attendus

**Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ATCC 25177	Positif = coloration jaune
**Mycobacterium intracellulare* Groupe III ATCC 13950	Négatif = aucun changement de couleur

*Souche de microorganisme recommandée pour le contrôle de qualité par l'utilisateur.

III CONTROLE DE QUALITE SUPPLEMENTAIRE

1. Examiner les tubes comme décrit à la rubrique « Détérioration du produit ».
2. Inspecter visuellement des tubes représentatifs pour s'assurer qu'aucun défaut physique ne peut interférer avec leur utilisation.
3. Incuber des tubes représentatifs non ensemencés entre 20 et 25 °C et 30 et 35 °C, et les examiner après 7 jours pour déceler une contamination microbienne éventuelle.

INFORMATIONS PRODUIT

IV APPLICATION

La Seven H11 Agar with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate (gélose Seven H11 avec acide aspartique et pyruvate de sodium) sert à l'isolement et l'identification des mycobactéries non chromogènes, notamment *Mycobacterium tuberculosis*.

V RESUME ET EXPLICATION

Middlebrook et Cohn ont amélioré la formulation de la gélose à base d'acide oléique et d'albumine et obtenu une croissance plus rapide et plus abondante de *Mycobacterium* sp. sur leur milieu appelé 7H10.[1,2] Cohn et al. ont modifié la formulation de la gélose 7H10 en y incorporant 1 g de produits de digestion pancréatique de caséine par litre afin de favoriser la croissance des souches de *Mycobacterium tuberculosis* qui présentaient une croissance faible ou nulle sur 7H10 et d'autres milieux d'isolement conventionnels.[3] Cette formulation est appelée Seven H11 Agar. L'acide aspartique ajouté améliore le taux de production[4] de la niacine tandis que le pyruvate de sodium favorise la croissance.

VI PRINCIPES DE LA METHODE

La grande variété de sels inorganiques présents dans la Seven H11 Agar apporte des substances indispensables à la croissance des mycobactéries. Converti en acide citrique, le citrate de sodium sert à maintenir certains cations inorganiques en solution. Le glycérol est une source abondante de carbone et d'énergie. Les produits de digestion pancréatique de caséine sont une source abondante d'azote nécessaire à la croissance du bacille tuberculeux et apportent plusieurs autres facteurs de croissance. L'acide oléique, ainsi que d'autres acides gras à longue chaîne assimilables par le bacille tuberculeux, jouent un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries. Le rôle principal de l'albumine est de protéger le bacille tuberculeux des agents toxiques et, par conséquent, de favoriser sa mise en évidence sur les milieux d'isolement primaire. Le vert malachite inhibe partiellement la croissance des bactéries. Le pyruvate de sodium est un facteur de croissance.

L'acide aspartique est incorporé pour favoriser la production de niacine. Toutes les mycobactéries produisent de l'acide nicotinique (niacine). En raison du blocage d'une voie métabolique de conversion de la niacine libre en mononucléotide d'acide nicotinique, *M. tuberculosis* accumule la niacine et l'excrète dans le milieu de culture, une caractéristique qui le distingue de la plupart des autres mycobactéries.[4]

VII REACTIFS

Seven H11 Agar with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate

Formule approximative* par litre d'eau purifiée

Digestion pancréatique de caséine	1,0	g
Sulfate de magnésium	0,05	g
Citrate d'ammonium ferrique	0,04	g
Citrate de sodium	0,4	g
Sulfate d'ammonium	0,5	g
Glutamate monosodique	0,5	g
Phosphate disodique	1,5	g
Phosphate monopotassique	1,5	g
Acide aspartique	1,0	g
Pyruvate de sodium	5,0	g
Gélose	13,5	g
Chlorure de sodium	0,85	g
Dextrose	2,0	g
Albumine bovine V	5,0	g
Catalase	3,0	mg
Pyridoxine	1,0	mg
Sulfate de zinc	1,0	mg
Sulfate de cuivre	1,0	mg
Biotine	0,5	mg
Chlorure de calcium	0,5	mg
Vert malachite	0,25	mg
Acide oléique	0,06	mL
Glycérol	5,0	mL

*Ajustée et/ou complémentée en fonction des critères de performances imposés.

Avertissements et précautions

Réservé au diagnostic *in vitro*.

Ouvrir avec précaution les tubes étroitement bouchés pour ne pas risquer d'être blessé par un bris de verre.

Des microorganismes pathogènes, notamment les virus de l'hépatite et de l'immunodéficience humaine, sont susceptibles d'être présents dans les échantillons cliniques. Respecter les « Précautions standard »[5-8] et les consignes en vigueur dans l'établissement pour manipuler tout

objet contaminé avec du sang ou d'autres liquides organiques. Après utilisation, stériliser à l'autoclave les tubes préparés, les récipients ayant contenu des échantillons et tout autre matériel contaminé avant de les éliminer.

Les manipulations non susceptibles de produire des aérosols d'échantillons cliniques, comme la préparation de frottis acido-résistants, nécessitent des pratiques et des méthodes de sécurité biologique de niveau 2, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Toutes les manipulations susceptibles de produire des aérosols doivent être effectuées sous hotte biologique de sécurité de classe I ou II. Les activités de laboratoire impliquant la propagation et la manipulation de cultures de *M. tuberculosis* et *M. bovis* nécessitent des pratiques de sécurité biologique de niveau 3, ainsi que les installations et le matériel de confinement correspondants. Les études chez l'animal nécessitent également des procédures particulières.[7]

Les méthodes de laboratoire impliquant des mycobactéries nécessitent un équipement et des techniques particulières afin de minimiser les risques microbiologiques. [4,9-11]

Voir « Préparation du bromure de cyanogène à 10 % » (étape 2 à la rubrique « Mode opératoire du test : Préparation des réactifs du test de la niacine ») pour connaître les précautions complémentaires.

Instructions pour la conservation

Dès réception, conserver les tubes dans l'obscurité, à une température de 2 à 8 °C. Ne pas les congeler ni les surchauffer. Ne pas ouvrir prématurément. Maintenir à l'abri de la lumière. Conservés comme indiqué sur l'étiquette, les milieux en tube peuvent être ensemencés jusqu'à la date de péremption et incubés pendant les durées d'incubation recommandées. Laisser le milieu s'équilibrer à température ambiante avant de l'ensemencer.

Détérioration du produit

Ne pas utiliser les tubes s'ils présentent des signes de contamination microbienne, décoloration ou dessiccation, ou d'autres signes de détérioration.

VIII PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Différents écouvillons et récipients ont été conçus pour recueillir les échantillons. Prélever les échantillons avant l'administration d'agents antimicrobiens. Veiller à les transmettre sans délai au laboratoire. Consulter les publications citées en référence pour plus d'informations.[11,12]

IX METHODE

Matériaux fournis

Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate

Matériaux requis mais non fournis

Milieux de culture auxiliaires, réactifs, souches de contrôle de qualité et matériel de laboratoire requis.

Mode opératoire du test

Respecter les techniques d'asepsie.

Le mode opératoire du test est celui recommandé par le CDC (U.S. Centers for Disease Control and Prevention) pour réaliser un isolement primaire à partir d'échantillons contenant des mycobactéries. La N-acétyl-L-cystéine-hydroxyde de sodium (NALC-NaOH) est l'agent recommandé pour obtenir une digestion et une décontamination douces mais efficaces. Ces réactifs sont fournis dans la trousse de décontamination/digestion d'échantillons **BBL MycoPrep**. Pour plus d'informations sur la méthode de décontamination et de culture, consulter les publications citées en référence.[4,9-11]

Incuber les tubes ensemencés en atmosphère aérobie, enrichie en dioxyde de carbone, en les maintenant à l'abri de la lumière. Incuber à 35 ± 2 °C.

Ensemencer les milieux en géloses inclinées sur un plan horizontal et laisser l'inoculum s'absorber.

Desserrer les bouchons à vis des tubes pendant les 3 premières semaines d'incubation pour permettre une circulation du dioxyde de carbone et la mise en route de la culture. Visser ensuite les bouchons pour éviter la déshydratation ; les desserrer brièvement une fois par semaine. Incuber les tubes verticalement si l'espace est limité.

REMARQUE : Si l'on suspecte la présence de *M. marinum* ou *M. ulcerans* dans des échantillons provenant de lésions cutanées, l'isolement primaire doit s'effectuer par incubation des cultures à

une température comprise entre 25 et 33 °C ; dans le cas de *M. avium* ou *M. xenopi*, la température idéale d'incubation est de 40 à 42 °C.[4] Incuber un double de la culture entre 35 et 37 °C.

Préparation des réactifs du test de la niacine**[4]

1. Préparation de l'aniline à 4 % :
   Ajouter 4,0 mL d'aniline incolore à 96 mL d'alcool éthylique à 95 %. Conserver dans un flacon en verre teinté entre 2 et 8 °C. Si la solution vire au jaune, la jeter et en préparer une nouvelle.
2. Préparation du bromure de cyanogène à 10 %

ATTENTION : Les vapeurs de bromure de cyanogène sont très irritantes et extrêmement toxiques ; préparer la solution sous une hotte de captation des vapeurs chimiques et tester les cultures sous une hotte biologique de sécurité.[4] AU CONTACT D'UN ACIDE, LE BROMURE DE CYANOGENE DEGAGE DU CYANURE TOXIQUE.[12] JETER LES TESTS DE LA NIACINE DANS UNE SOLUTION GERMICIDE RENDUE ALCALINE PAR AJOUT DE SOUDE.

Dissoudre 5 g de bromure de cyanogène dans 50,0 mL d'eau purifiée. Conserver dans un flacon en verre teinté bien bouché entre 2 et 8 °C. Si un précipité se forme à cette température, porter à température ambiante pour le dissoudre. Préparer de petites quantités car le réactif est volatile et perd de sa réactivité. Les solutions faiblement réactives risquent de donner de faux négatifs.
La bandelette réactive **BBL Taxo TB Niacin Test Strip est préférable à des réactifs de test préparés au laboratoire (bandelettes réactives, réf. 231741 ; contrôle **Taxo** TB Niacin Test Control, réf. 231735). Suivre le mode d'emploi correspondant.

Contrôle de qualité par l'utilisateur
Voir « Procédures de contrôle de qualité ».

Effectuer les contrôles de qualité conformément aux réglementations nationales et/ou internationales, aux exigences des organismes d'homologation concernés et aux procédures de contrôle de qualité en vigueur dans l'établissement. Il est recommandé à l'utilisateur de consulter les directives CLSI et la réglementation CLIA concernées pour plus d'informations sur les modalités de contrôle de qualité.

X RESULTATS[4]

Tester la production de niacine par toutes les mycobactéries non chromogènes (voir II, B., 3. ci-dessus) ; seules les souches non chromogènes d'aspect rugueux doivent être testées pour la production de niacine. La culture doit être âgée de 3 à 4 semaines et compter au moins 50 à 100 colonies. *M. tuberculosis* et *M. simiae*, plus rare, donnent habituellement un résultat positif au test de production de niacine. La plupart des autres mycobactéries donnent un résultat négatif à ce test.

XI LIMITES DE LA PROCEDURE

Certaines souches de *M. simiae*, du BCG et d'autres mycobactéries accumulent également la niacine. Il est recommandé d'effectuer un test de réduction des nitrates et un test de la catalase à 68 °C pour confirmer l'identité de *M. tuberculosis*.[4,11]

XII CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Les caractéristiques de performances de tous les lots de Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate sont testées en usine. A l'aide d'un ensemenceur à anse calibrée de 0,01 mL, des échantillons représentatifs du lot sont ensemencés par striage avec des cultures de *Mycobacterium intracellulare* Group III (ATCC 13950) and *M. tuberculosis* (ATCC 25177) diluées à 10^5 unités formant colonies (UFC) par mL. Les tubes ensemencés sont incubés, bouchons desserrés, à 35 ± 2 °C, en atmosphère enrichie de 5 à 10 % de dioxyde de carbone. Les tubes sont examinés après 7, 14 et 21 jours d'incubation pour apprécier la croissance bactérienne. Lorsque la croissance obtenue est suffisante (50 à 100 colonies au minimum), la production de niacine est testée à l'aide de bandelettes réactives **Taxo** TB Niacin Test Strips. Une coloration jaune dans le bouillon extrait indique un résultat positif de *M. tuberculosis* ; *M. intracellulare* donne un résultat négatif (le bouillon demeure incolore).

XIII CONDITIONNEMENT

N° réf.	Description
221958	**BBL** Seven H11 Agar Slants with Aspartic Acid and Sodium Pyruvate, coffret de 10 tubes de tailles A

XIV REFERENCES

1. Middlebrook, G., and M.L. Cohn. 1958. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. Am. J. Public Health. *48*:844-853.
2. Middlebrook, G., M.L. Cohn, W.E. Dye, W.B. Russell, Jr., and D. Levy. 1960. Microbiologic procedures of value in tuberculosis. Acta Tuberc. Scand. *38*:66-81.
3. Cohn, M.L., R.F. Waggoner, and J.K. McClatchy. 1968. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis. *98*:295-296.
4. Kent, P.T., and G.P. Kubica. 1985. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. USDHHS. Centers for Disease Control, Atlanta.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Approved Guideline M29-A2. Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections, 2nd ed. NCCLS, Wayne, Pa.
6. Garner, J.S. 1996. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee, U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Guideline for isolation precautions in hospitals. Infect. Control Hospital Epidemiol. *17*:53-80.
7. U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories, HHS Publication (CDC), 4th ed. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.
8. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work (seventh individual directive within the meaning of Article 16(1) of Directive 89/391/EEC). Official Journal L262, 17/10/2000, p. 0021-0045.
9. Cernoch, P.L., R.K. Enns, M.A. Saubolle, and R.J. Wallace, Jr. 1994. Cumitech 16A, Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Coordinating ed., A.S. Weissfeld. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 2002. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 11th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
11. Metchock, B.G., F.S. Nolte, and R.J. Wallace, Jr. 1999. Mycobacterium, p. 399-437. *In* P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H.Yolken (ed.), Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Lutz, B. 1992. Identification tests for mycobacteria. Part 6, Niacin accumulation, p. 3.12.11-3.12.14. *In* H.D. Isenberg (ed.), Clinical microbiology procedures handbook, vol.1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Becton, Dickinson and Company
7 Loveton Circle
Sparks, Maryland 21152 USA
800-638-8663

EC REP BENEX Limited
Bay K 1a/d, Shannon Industrial Estate
Shannon, County Clare, Ireland
Tel: 353-61-47-29-20
Fax: 353-61-47-25-46

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection.
BD, BD Logo, BBL, MycoPrep and Taxo are trademarks of Becton, Dickinson and Company. ©2006 BD